



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

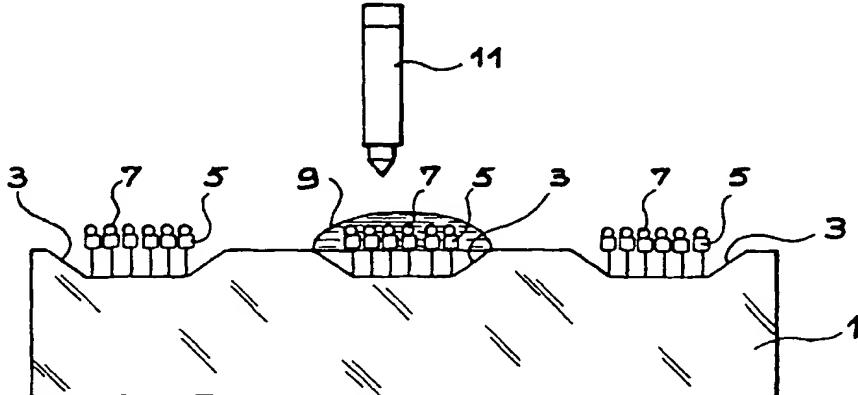
(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>B01J 19/00, C07H 21/00</b>	A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/53310</b> (43) Date de publication internationale: 14 septembre 2000 (14.09.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00550		(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Date de dépôt international: 6 mars 2000 (06.03.00)		
(30) Données relatives à la priorité: 99/02819 8 mars 1999 (08.03.99) FR		Publiée Avec rapport de recherche internationale.
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): COMMIS-SARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de La Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR).		
(72) Inventeurs; et		
(75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): ROSILIO, Charles [FR/FR]; 16, allée de la Pommeraie, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR). VINET, Françoise [FR/FR]; 22, boulevard Edouard Rey, F-38000 Grenoble (FR). VAUCHIER, Claude [FR/FR]; 2, impasse Jacques-Henri Lartigue, F-38120 Saint-Egrève (FR). CLERC, Jean-Frédéric [FR/FR]; 8, rue du Mont Pertuis, F-38120 Le Fontanil (FR).		
(74) Mandataire: DES TERMES, Monique; Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).		

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING A MATRIX OF SEQUENCES OF CHEMICAL OR BIOLOGICAL MOLECULES FOR A CHEMICAL OR BIOLOGICAL ANALYSIS DEVICE

(54) Titre: PROCEDE DE REALISATION D'UNE MATRICE DE SEQUENCES DE MOLECULES CHIMIQUES OU BIOLOGIQUES POUR DISPOSITIF D'ANALYSE CHIMIQUE OU BIOLOGIQUE

(57) Abstract

The invention concerns the production of a matrix of sequences of chemical or biological molecules, and more particularly of oligonucleotides by *in situ* synthesis on a substrate comprising microwells. Said substrate comprises microwells (3) which can, for example, be functionalised by reactive groups (5) protected by protector groups (7). In order to couple the first molecule of the desired sequences on the selected microwells, the method consists in: covering the other microwells with a protective polymer (9), then in performing a chemical reaction on the unprotected microwells, for example by eliminating the protector groups (7) and by coupling the reactive groups (5) with the first molecule of the sequence, then in repeating said operations with other molecules on other microwells, after removing the protective polymer and resetting the protective polymer on the microwells which should not contain the next molecule.



(57) Abrégé

L'invention concerne la réalisation d'une matrice de séquences de molécules chimiques ou biologiques, et plus particulièrement d'oligonucléotidiques par synthèse in situ sur un substrat comportant des microcuvettes. Ce substrat comporte des microcuvettes (3) qui peuvent par exemple être fonctionnalisées par des groupes réactifs (5) protégés par des groupes protecteurs (7). Pour coupler la première molécule des séquences voulues sur les microcuvettes choisies, on recouvre les autres microcuvettes d'une polymère de protection (9), puis on réalise une réaction chimique sur les microcuvettes non protégées, par exemple en éliminant les groupes protecteurs (7) et en couplant les groupes réactifs (5) avec la première molécule de la séquence, puis on renouvelle ces opérations avec d'autres molécules sur d'autres microcuvettes, après avoir éliminé la polymère de protection et déposé à nouveau du polymère de protection sur les microcuvettes qui ne doivent pas comporter la molécule suivante.

*UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettanie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	VU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**PROCEDE DE REALISATION D'UNE MATRICE DE SEQUENCES DE MOLECULES CHIMIQUES OU BIOLOGIQUES POUR DISPOSITIF D'ANALYSE CHIMIQUE OU BIOLOGIQUE.**

**DESCRIPTION**

**5 Domaine technique**

La présente invention a pour objet un procédé de réalisation en parallèle d'une matrice de séquences de molécules chimiques ou biologiques pour dispositif d'analyse chimique ou biologique.

10 Les molécules chimiques ou biologiques peuvent être en particulier des aminoacides ou des nucléotides, les séquences étant alors des peptides ou des oligonucléotides.

15 Elle s'applique en particulier à la réalisation d'une matrice de sondes d'oligonucléotides de différentes séquences pour l'analyse ou le diagnostic ou la recherche en génétique (mutations, polymorphismes, transcriptome).

**Etat de la technique antérieure**

20 De nouveaux systèmes ou dispositifs d'analyse chimique ou biologique sont utilisés pour le séquençage et l'étude de l'expression des gènes. Ils sont constitués d'un ensemble de sondes moléculaires (oligonucléotides) fixées sur la surface miniaturisée 25 d'un substrat afin de réaliser une biopuce ou puce à ADN.

Au cours de l'analyse d'un échantillon, les acides nucléiques cibles extraits sont marqués et

WO 00/53310

déposés sur la matrice de sondes. L'hybridation (appariement entre les brins complémentaires de la double hélice d'ADN) entre les sondes et les cibles marquées permet de repérer et d'identifier les séquences de l'échantillon d'ADN.

5 De nombreux procédés de réalisation ont été décrits et développés pour améliorer la miniaturisation et la capacité de densité de sites d'analyse sur la puce.

10 Différentes techniques de greffage et d'immobilisation des sondes (par liaison covalente ou électrostatique) sur différents substrats (silicium, verre, polymère, électrodes en or ...) ont fait l'objet de recherches et de développements industriels.

15 Les matrices de sondes sont alors réalisées - soit par l'immobilisation d'oligonucléotides présynthétisés par greffage de ceux-ci sur un substrat fonctionnalisé ou sur un polymère conducteur, - soit par synthèse *in situ* des oligonucléotides

20 sondes sur le substrat.

Les procédés de synthèse *in situ* utilisés jusqu'à présent font appel à deux modes d'adressage différents des sites, qui sont soit l'adressage manuel par microrobot comme il est décrit dans US-A-5 474 796 [1], et l'adressage photochimique comme il est décrit dans WO-A-97/39 151 [2].

25 Dans le document US-A-5 474 796 [1], on forme tout d'abord sur le substrat des sites fonctionnalisés en utilisant des photorésists ou des masques pour définir les différents sites du substrat, puis on forme les séquences d'oligonucléotides sur les sites fonctionnalisés par injection des réactifs sur les sites voulus au moyen d'une pompe piézo-électrique.

Dans le document WO-A-97/39151 [2], on soumet tout d'abord le substrat à un traitement pour le munir de groupes fonctionnels protégés avec un groupe protecteur photolabile, puis on déprotège certains 5 groupes fonctionnels du substrat par irradiation selective à travers un masque pour définir les sites et on fait réagir ensuite sur ces sites un nucléotide pour construire la séquence voulue.

Dans les deux cas, la synthèse in situ met 10 en jeu les réactions classiques de couplage par l'intermédiaire des phosphoramidites, des phosphites ou des phosphonates, pour la condensation successive des nucléotides judicieusement protégés. Le cycle de synthèse comprend les étapes de déprotection, couplage, 15 blocage et oxydation, et permet de faire croître l'oligonucléotide à partir de la surface de chaque site.

Dans l'adressage photochimique, on réalise 20 les étapes de déprotection des nucléotides par la lumière. L'adressage des sites se fait par une étape de lithographie (insolation au travers d'un masque). Le groupement protecteur photolabile est éliminé par la lumière, permettant ainsi de réaliser le couplage ultérieur par trempage du substrat dans une solution 25 d'un nucléotide activé (par exemple d'un phosphoramidite), en présence d'un catalyseur, par exemple le tétrazole.

Ce procédé de synthèse combinatoire dirigé 30 par la lumière nécessite la réalisation d'un nombre de masques égal au nombre de nucléotides qui composent l'oligonucléotide et constitue une opération coûteuse et fastidieuse. Si ce procédé présente l'avantage de conduire à des puces de très haute densité (résolution

WO 00/53310

4

du procédé de photolithographie), le rendement des réactions photochimiques (élimination des groupements photolabiles) n'est par contre jamais de 100 %, et on ne peut être sûr de la pureté de la séquence oligonucléotidique réalisée sur la puce.

5 Dans le cas du document US-A-5 474 796 [1],

qui utilise la technique d'impression par jets (têtes piézo-électriques) pour distribuer sur les différents sites de la puce, les 4 nucléotides activés de base de l'ADN ainsi que les réactifs de couplage, la synthèse 10 en phase solide sur des sites d'une centaine de  $\mu\text{m}^2$ , avec des quantités de réactifs de l'ordre du nanolitre, exige des conditions d'atmosphère contrôlée 15 (sensibilité à l'humidité et l'oxygène) difficiles à réaliser dans l'environnement d'un microdispenseur et de ses équipements associés. Elle nécessite par 20 ailleurs des solvants à haut point d'ébullition et des réactifs peu volatils.

On connaît encore des procédés de synthèse in situ d'oligonucléotides utilisant des masques pour définir les zones du substrat qui doivent être soumises aux cycles successifs de synthèse.

Ainsi le document EP-A-0 728 520 [3] décrit 25 un procédé de réalisation de matrices de sondes d'oligonucléotides utilisant un substrat comportant sur toute sa surface des groupes fonctionnels protégés, destinés à l'accrochage des nucléotides, et un matériau 30 barrière pour définir les zones du substrat à modifier. Ce matériau peut être choisi parmi les laques, les huiles liquides, les polyesters, les polyuréthannes et les résines époxy qui sont généralement des prépolymères liquides. Il est déposé par différentes techniques d'impression. Après dépôt de la barrière, on

procède à la déprotection en phase vapeur des groupes fonctionnels non recouverts du matériau barrière. L'utilisation d'une phase vapeur est nécessaire car le matériau barrière utilisé est soluble ou entraîné dans les solvants de déprotection. Mais la protection en phase vapeur pose des problèmes de risque de toxicité dans l'environnement et d'attaque par diffusion de matériaux.

Le document US-A-5 658 734 [4] utilise un substrat totalement fonctionnalisé et les techniques de lithographie avec emploi d'un photorésist pour définir les zones du substrat à modifier en intercalant entre le substrat et le photorésist, un polymère qui joue le rôle de tampon. Ce procédé utilise ainsi un photorésist qui doit être déposé à la tournette, sur la couche de polymère déposée sur le substrat, à chaque cycle additionnel d'un nucléotide, ce qui nécessite une étape de lithographie à chaque cycle (deux dépôts à la tournette, recuit thermique, insolation à travers un masque, développement de la résine photosensible, puis développement du polymère tampon). Après les étapes de déprotection des groupes fonctionnels du substrat et d'addition d'un nucléotide, à travers les ouvertures pratiquées dans le polymère, les deux couches sont éliminées dans un solvant. Dans ce procédé, le polymère permet d'isoler le photorésist de la couche biologique de nucléotide. Ce système nécessite donc en plus des étapes de dépôt à la tournette et de lithographie, la réalisation d'un grand nombre de masques.

Un autre inconvénient de ce procédé réside dans le risque de « lift off » de la couche protectrice au cours du développement du polymère protecteur. En effet par diffusion du solvant sous la couche de

WO 00/53310

6

photorésist, on peut avoir un décollement du polymère sur les sites protégés.

La présente invention a précisément pour objet un procédé de réalisation d'une matrice de séquences de molécules chimiques ou biologiques, par exemple d'oligonucléotide, qui permet de pallier les inconvénients des procédés décrits ci-dessus.

#### Exposé de l'invention

Le procédé de l'invention utilise un dépôt localisé sélectif d'un polymère protecteur sur un substrat structuré avec des microcuvettes fonctionnalisées. Le polymère protecteur est capable de protéger momentanément les microcuvettes choisies lors d'une réaction chimique conduisant au couplage avec la molécule de l'enchaînement suivant. Un adressage mécanique par microdéposition sur les microcuvettes choisies, remplace l'adressage photochimique ou électrique et les techniques de lithographie ou d'impression utilisées dans les autres procédés de synthèse combinatoire, par exemple pour la réalisation de sondes d'oligonucléotides.

Selon l'invention le procédé de réalisation d'une matrice de séquences de molécules chimiques ou biologiques formées d'enchaînements différents de molécules chimique ou M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, ... M<sub>n</sub>, par synthèse in situ sur un substrat structuré avec des microcuvettes, comprend les étapes suivantes :

1) fonctionnalisation des microcuvettes du substrat par des groupes fonctionnels capables de former une liaison covalente avec les molécules M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, ... M<sub>n</sub> ;

2) dépôt d'un polymère de protection sur au moins l'une des microcuvettes par microdéposition de gouttes dudit polymère pour constituer sur le (les) microcuvette(s) sélectionnée(s) des couvercles de 5 polymère solide ;

3) réalisation d'une ou plusieurs réactions chimiques pour assurer le couplage d'une première molécule M1 sur les groupes fonctionnels des microcuvettes non recouvertes de polymère de 10 protection ;

4) élimination du polymère de protection sur les microcuvettes recouvertes de ce polymère, après la première réaction ou l'une des réactions suivantes effectuées dans l'étape 3) ; et

15 5) réalisation à nouveau des étapes 2), 3) et 4) pour obtenir les séquences d'enchaînement voulu sur chacune des microcuvettes fonctionnalisées.

Le procédé de l'invention permet ainsi par un choix judicieux du polymère de protection et d'un 20 solvant de dissolution du polymère compatible avec les protocoles d'un automate de synthèse, de réaliser la synthèse de matrices d'oligonucléotides, dans des microcuvettes ou microréacteurs gravés dans un substrat. Pour ce faire, on associe un synthétiseur 25 automatique d'oligonucléotides à un dispositif d'adressage mécanique (robot de microdéposition ou impression par jets d'encre) d'un polymère de protection.

L'adressage mécanique consiste à réaliser 30 sélectivement un dépôt de polymère sur les microcuvettes choisies, constituant un couvercle solide et étanche ajusté sur les microcuvettes afin de délimiter et sélectionner des zones actives vis-à-vis

des réactifs mis en œuvre pour l'addition des unités monomères de l'enchaînement suivant.

Le procédé de l'invention donne la possibilité d'un choix de polymères protecteurs dont les propriétés de protection, d'insolubilité, d'étanchéité et de dépôt (forme et épaisseur contrôlées) sont compatibles et adaptées à l'une ou plusieurs étapes du cycle de synthèse.

Le procédé de l'invention permet d'éliminer le polymère de protection, soit après la première réaction chimique du cycle de couplage, soit après un cycle de couplage complet.

Le procédé de l'invention permet d'inclure l'élimination de ce couvercle en polymère dans le cycle classique de synthèse automatique des oligonucléotides, soit dans l'une des étapes de rinçage, soit dans une étape additionnelle de rinçage dans un solvant compatible avec ceux utilisés habituellement dans le synthétiseur automatique d'oligonucléotides (acéto-nitrile, dichlorométhane, tétrahydrofurane).

Dans le procédé de l'invention, l'étape 1) de fonctionnalisation des microcuvettes peut être effectuée en mettant en œuvre les étapes suivantes :

- a) fonctionnaliser la surface totale du substrat et des microcuvettes par les groupes fonctionnels ;
- b) déposer un polymère de protection sur toutes les microcuvettes par microdéposition de gouttes dudit polymère pour constituer des couvercles de polymère solide sur toutes les microcuvettes ;
- c) faire réagir les groupes fonctionnels présents sur le substrat autour des microcuvettes avec un groupe bloquant non labile dans les conditions utilisées pour

les réactions chimiques de couplage et pour l'élimination du polymère de protection ; et

d) éliminer le polymère de protection de toutes les microcuvettes.

5 De préférence, après l'étape a) on protège les groupes fonctionnels par un groupe protecteur labile, et on effectue une déprotection des groupes fonctionnels après l'étape b) et avant de réaliser l'étape c).

10 De même, on réalise de préférence une protection des groupes fonctionnels des microcuvettes lors de la mise en œuvre du procédé de l'invention. Dans ce cas, on protège les groupes fonctionnels des microcuvettes par un groupe protecteur labile, et  
15 l'étape 3) comprend une première réaction de déprotection des groupes fonctionnels.

Selon l'invention, les molécules M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, ... M<sub>n</sub> peuvent être de différents types. A titre d'exemple, il peut s'agir d'acides aminés naturels ou  
20 synthétiques L- ou D-, de nucléotides (ARN ou ADN), de pentose ou d'hexose. Dans le cas des acides aminés le nombre de molécules M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, ... M<sub>n</sub> peut être important. Dans le cas des nucléotides, le nombre de molécules est plus limité puisqu'il inclut A, T (ou U), G et C.

25 Dans ce cas, les nucléotides peuvent être sous forme de phosphoramidites, de phosphotriesters ou de H-phosphonates selon le type de synthèse nucléotidique mise en œuvre. Ces molécules comportent deux fonctions réactives (hydroxyle et fonction avec  
30 phosphore) dont l'une, la fonction hydroxyle, est protégée par un groupe protecteur, de préférence identique au groupe protecteur des sites fonctionnalisés.

Un groupe protecteur approprié peut être en particulier un groupe trityle ou dérivé de trityle, par exemple le groupe diméthoxytrityle.

Lorsqu'on utilise le procédé de l'invention pour la réalisation de séquences d'oligonucléotides par synthèse phosphoramidite, l'étape 3) correspond à un cycle de synthèse et elle comprend l'élimination des groupes protecteurs trityle, le couplage avec un nucléotide, la réaction des groupes fonctionnels qui n'ont pas été couplés au nucléotide, avec un groupe bloquant, et l'oxydation en phosphate du groupement phosphoramidite du nucléotide.

Dans le procédé de l'invention, les étapes de déprotection (ou détritylation), de couplage, de blocage, d'oxydation et d'élimination du polymère de protection sont réalisées dans un synthétiseur automatique d'oligonucléotides en ayant introduit une modification de la chambre de réaction, permettant de traiter des substrats de taille variable.

Le groupe bloquant utilisé dans l'étape de blocage est un groupe non labile dans les conditions d'élimination des groupes protecteurs des groupes fonctionnels des microcuvettes.

A titre d'exemple, on peut utiliser pour cette réaction de blocage une solution de diméthylaminopyridine DMAP dans du tétrahydrofurane et de la lutidine.

Dans le procédé de l'invention, les étapes de déprotection, de couplage, d'élimination du matériau de protection et éventuellement d'oxydation, sont réalisées par trempage du substrat, soit dans la chambre de réaction du synthétiseur, soit dans les bains de réactifs appropriés. Seule l'étape d'adressage

des microcuvettes, qui correspond à une protection sélective des microcuvettes choisies par le polymère de protection est effectuée à l'aide de techniques de microdéposition.

5 Avantageusement, le polymère de protection est déposé sur les microcuvettes voulues à l'état liquide par adressage mécanique en utilisant des techniques de microdéposition sélective du type actuateur piézoélectriques, « pin and ring »,  
10 impression par jets d'encre, vis d'Archimède et micropipettage.

Ce polymère peut être en solution dans un solvant et, dans ce cas, on recuit le film de polymère formé par chauffage du substrat à une température de 50  
15 à 100°C, avant d'effectuer l'étape 3) ou l'étape c).

L'adressage du polymère par microdéposition permet de protéger sélectivement des microcuvettes durant l'une ou plusieurs des quatre réactions de synthèse correspondant au couplage d'une unité nucléotidique. Il permet de distribuer localement sur les microcuvettes sélectionnées des gouttelettes calibrées d'un polymère en solution. Après évaporation du solvant, elles constituent des couvercles étanches ajustés sur les microcuvettes. Cet adressage se fait de préférence avant l'étape de détritylation ou avant  
25 l'étape de couplage dans le cycle de synthèse des oligonucléotides.

L'originalité du procédé réside dans les grandes possibilités d'adapter le choix du polymère et  
30 de son rôle protecteur aux différentes étapes de la synthèse des oligonucléotides,

Dans le procédé de l'invention, le choix du polymère protecteur est très important et doit répondre à un certain nombre de critères.

Tout d'abord, ce polymère doit pouvoir être 5 déposé par les techniques de microdéposition citées précédemment, par l'intermédiaire d'une solution du polymère dans un solvant, de manière à former des gouttelettes calibrées et ajustées sur les microcuvettes. Un recuit à une température de 50 à 80°C 10 pour éliminer le solvant et améliorer l'adhérence sur le substrat est généralement nécessaire.

Dans le cas idéal où le polymère est protecteur pendant les quatre étapes du cycle de synthèse, celui-ci doit être inerte et de préférence 15 exempt de fonctions réactives capables de se coupler aux molécules et réactifs de synthèse. Il ne doit pas être soluble dans les solvants utilisés dans les étapes du cycle et présenter une imperméabilité vis-à-vis de ces solvants.

En réalité, il suffit que le polymère joue 20 son rôle de couvercle protecteur essentiellement dans l'étape de détritylation ou dans l'étape de couplage. Il est possible alors d'adapter et d'optimiser le couple polymère-solvants pour l'étape retenue.

Il est préférable que le polymère de 25 protection ne comporte pas de fonctions avec des hydrogènes libres du type OH, NH<sub>2</sub> ou COOH qui seraient capables de se coupler avec les molécules M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, ... Mn, par exemple les nucléotides, au cours de 30 l'étape de couplage, pour éviter de consommer inutilement des réactifs qui seront éliminés ensuite avec le polymère de protection.

Le polymère doit pouvoir être éliminé par un solvant inerte vis-à-vis des nucléotides et il doit de plus présenter des propriétés physico-chimiques en solution telles qu'une viscosité et une tension superficielle, permettant son dépôt sur les microcuvettes par la technique de microdéposition choisie.

Dans le procédé de l'invention, le choix du polymère de protection est effectué en fonction de la (des) étape(s) pendant lesquelles il doit protéger les microcuvettes, en tenant compte de sa solubilité dans les solvants susceptibles d'être utilisés pour la synthèse des oligonucléotides.

Si l'on veut assurer la protection par le polymère uniquement pendant l'étape d'élimination des groupes protecteurs des groupes fonctionnels, soit pendant l'étape de détritylation, il suffit de choisir un polymère insoluble dans les réactifs de détritylation qui sont généralement constitués par de l'acide dichloroacétique (DCA) ou trichloroacétique (TCA) ou un acide de Lewis du type  $ZnBr_2$ , à environ 2-5 % dans un solvant tel que le dichlorométhane, l'acetonitrile ou le toluène.

A titre d'exemples de tels polymères, on peut citer les alcools polyvinyliques insolubles dans le dichlorométhane, l'acetonitrile et le toluène ; les polyhydroxystyrènes insolubles dans le dichlorométhane ; les polystyrènes, les polyvinylcarbazoles et les polyimides insolubles dans l'acetonitrile ; et les poly(oxyde d'éthylène) insolubles dans le toluène. ,

Si l'on veut assurer une protection des microcuvettes par le polymère seulement pendant l'étape

de couplage, il convient de choisir un polymère insoluble dans le solvant utilisé pour le couplage, généralement l'acétonitrile.

Dans ce but, on peut utiliser un polymère choisi dans le groupe constitué de polymères et de leurs dérivés du type des alcools polyvinyliques, des polystyrènes, des polyvinylcarbazoles et des polyimides qui sont insolubles dans ce solvant.

Le polymère de protection est choisi également en fonction des solvants susceptibles d'assurer son élimination par dissolution. De préférence, on choisit des polymères solubles dans des solvants compatibles avec ceux utilisés habituellement dans les synthétiseurs automatiques d'oligonucléotides, qui sont généralement le dichlorométhane (pour la détritylation), l'acétonitrile (pour le couplage proprement dit) et le tétrahydrofurane (pour le blocage et l'oxydation). Toutefois, d'autres solvants tels que l'acétonitrile et le toluène, peuvent être utilisés à la place du dichlorométhane pour la détritylation, sans perte de rendement.

Dans le tableau 1 qui suit, on a donné les polymères susceptibles d'être utilisés, leurs propriétés de solubilité dans divers solvants, leur utilisation possible dans une ou plusieurs étapes du procédé de l'invention et leur mode d'élimination.

Tableau 1

POLYMER	SOLUBILITE (solvants)	INSOLUBILITE (solvants)	ETAPES POSSIBLES POUR PROTECTION	ELIMINATION
<b>PVA</b> Polyvinyl-alcool	Eau, DMSO	CH <sub>3</sub> CN ; THF ; CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , Toluène	Détritylation et couplage dans CH <sub>3</sub> CN, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , ou toluène Blocage et oxydation dans THF	Elimination dans l'eau ou DMSO
Polystyrène (PS)	Toluène Acétone CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN	- détritylation dans CH <sub>3</sub> CN - couplage dans CH <sub>3</sub> CN	Elimination dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Polyhydroxy-styrène (PHS) ou résine Shipley XP 8843	CH <sub>3</sub> CN THF, Alcool, Acétone, PGMA	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Détritylation dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Elimination dans CH <sub>3</sub> CN
Polyéthylène-oxyde (PEO)	CH <sub>3</sub> CN CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Eau	THF, toluène	Détritylation dans le Toluène	Elimination dans eau CH <sub>3</sub> CN CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Polyvinyl-carbazole (PVK)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Chlorobenzène	CH <sub>3</sub> CN	Détritylation et couplage dans CH <sub>3</sub> CN	Elimination dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Polyimide XU 5218 (Ciba Geigy)	Anisole et CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN	Détritylation dans CH <sub>3</sub> CN et couplage dans CH <sub>3</sub> CN	Elimination dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>

Parmi les polymères du tableau 1, l'alcool polyvinyle est intéressant car il peut assurer une protection des microcuvettes pendant toutes les étapes de la synthèse d'oligonucléotides. De plus, il est facilement utilisable dans les robots de microdéposition. En revanche, son élimination est moins aisée car l'eau et le DMSO ne font pas partie des solvants de synthèse et nécessiteront de ce fait une étape complémentaire ainsi qu'un séchage.

Ainsi, dans le cas de la réalisation des sondes par utilisation d'un synthétiseur automate (support d'échantillon adapté) couplé à un robot microdispenseur (par capillarité, piézo-électrique ou du type «pin and ring»), il est préférable de ne pas utiliser un polymère protecteur soluble dans l'eau, qui nécessiterait à la fois un dépôt et une étape d'élimination en milieux aqueux ; ceci peut être gênant pour la poursuite de la synthèse qui est réalisée en milieu anhydre.

Pour éviter tout traitement de séchage supplémentaire, il est plus judicieux de choisir pour la protection sélective des microcuvettes un polymère qui sera éliminé dans un solvant anhydre et compatible avec le cycle des solvants utilisés dans le synthétiseur automate.

Par exemple, le polystyrène peut servir de polymère de protection sélective dans l'étape de détritylation réalisée dans l'acetonitrile (TCA 2%) dans lequel il est insoluble ; l'étape suivante de couplage se fait dans l'acetonitrile (tétrazole) ; le polymère peut alors être éliminé par un cycle de rinçage dans le dichlorométhane dans lequel il est très soluble. De plus, le polystyrène est inerte et ne

présente pas des fonctions OH capables de fixer des nucléotides actifs et il peut jouer également son rôle protecteur dans l'étape de couplage (dans l'acétonitrile).

Le polyhydroxystyrène est lui aussi intéressant car il est plus facile à déposer que le polystyrène et facilement éliminé dans un solvant classique du synthétiseur. En revanche, il ne peut assurer la protection que pendant l'étape de détritylation dans le dichlorométhane mais peut être éliminé par un cycle de rinçage dans l'acétonitrile avant l'étape de couplage dans ce solvant.

Le poly(oxyde d'éthylène) ne convient lui aussi que pour la détritylation à condition d'effectuer celle-ci dans le toluène, mais il est facilement éliminé dans  $\text{CH}_3\text{CN}$  ou  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Le polyvinylcarbazole et le polyimide peuvent assurer une protection pendant les étapes de détritylation et de couplage dans  $\text{CH}_3\text{CN}$ , puis être éliminés au moyen de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , qui fait partie des solvants utilisés dans les synthétiseurs. Cependant, le dépôt de ces polymères est plus difficile.

L'élimination du polymère de protection peut se faire directement dans le synthétiseur, dans une étape de rinçage, introduite dans le protocole du cycle du synthétiseur automatique.

Par exemple le solvant classique utilisé dans l'étape de détritylation, le dichlorométhane peut être remplacé par des solvants comme l'acétonitrile, le toluène, le xylène, ou encore un solvant aromatique halogéné, sans perte d'efficacité de la réaction de détritylation par le réactif acide utilisé habituellement (TCA ou DCA).

Le procédé de l'invention présente de nombreux avantages par rapport aux procédés de l'art antérieur.

En effet, par rapport au procédé de la référence [2] qui utilise un adressage photochimique pour la synthèse *in situ* ou celui de la référence [4] qui utilise un procédé lithographique, le procédé de l'invention évite la nécessité de réaliser des masques, c'est-à-dire des opérations longues et coûteuses, car il s'agit de réaliser un nombre de masques égal au nombre de molécules M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, ... M<sub>n</sub> qui constituent les séquences. De plus, dans le cas de l'adressage photochimique, la déprotection n'est pas totale et plus la séquence est longue, plus la probabilité d'obtenir la séquence voulue est faible. De ce fait, on constitue la séquence voulue sur le substrat des séquences redondantes, ce qui n'est pas nécessaire dans l'invention où la déprotection est totale.

Par rapport au procédé de la référence [1], le procédé de l'invention est plus facile à mettre en œuvre car les réactions de couplage peuvent être effectuées avec un excès de réactifs alors que, selon la référence [1], les réactions de couplages sont effectuées avec quelques nl de réactifs directement sur le site à modifier dans des conditions particulières, soit en atmosphère d'azote ou d'argon.

Par rapport à la référence [3], le procédé de l'invention est plus facile à mettre en œuvre car les microcuvettes, ou sites de synthèse, sont définis préalablement, la protection est plus étanche par mise en place de couvercles de polymère solide et les réactions de déprotection peuvent être effectuées en

phase liquide directement dans un synthétiseur automatique, et non pas en phase vapeur.

Dans le procédé de l'invention, le dépôt du polymère de protection sur les microcuvettes 5 sélectionnées par microdéposition ne nécessite pas de précautions particulières, la seule condition étant que la gouttelette de polymère recouvre la microcuvette à protéger.

D'autres caractéristiques et avantages de 10 l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit, donnée bien entendu à titre illustratif et non limitatif en référence aux dessins annexés.

#### **Brève description des dessins**

15 Les figures 1A à 1G illustrent les différentes étapes du procédé de l'invention pour la réalisation d'une matrice de sondes d'oligonucléotides.

La figure 2 illustre le profil d'une microcuvette de (650 x 650 x 24  $\mu\text{m}^3$ ) remplie de 20 polymère.

Les figures 3 et 4 sont des vues de dessus de microcuvettes remplies ou non de polymère.

#### **Exposé détaillé des modes de réalisation**

Pour mettre en œuvre le procédé de 25 l'invention, on part d'un substrat en verre ou de préférence en silicium, structuré avec des microcuvettes au pas de 150  $\mu\text{m}$  à quelques mm, mais de préférence quelques centaines de  $\mu\text{m}$  et de profondeur de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ . Ces microcuvettes calibrées sont

réalisées par des méthodes classiques de photolithographie et de gravure.

Sur la figure 1A, on voit le substrat 1 muni des microcuvettes 3. Les microcuvettes 3 sont 5 fonctionnalisées par des groupes fonctionnels hydrophiles 5 tels que des groupes hydroxyles, qui sont protégés par des groupes protecteurs 7. Ces groupes protecteurs peuvent être des groupes diméthoxytrityle, habituellement utilisés en synthèse oligonucléotidique.

10 Lorsque le substrat est une plaquette en silicium, la fonctionnalisation des sites peut être effectuée de la façon suivante.

La surface de la plaquette en silicium est tout d'abord oxydée en  $\text{SiO}_2$  par voie thermique, par exemple sur une épaisseur de 5000 Å, puis activée par nettoyage oxydant en milieu alcalin ou acide en Si-OH. Ensuite, on procède à une fonctionnalisation de la surface totale du substrat par traitement avec un agent de silanisation fonctionnalisé du type aminosilane ou 20 époxysilane avec une molécule de liaison ou bras espaceur du type glycol, par exemple un silane comportant un groupement N(bis-hydroxyméthyle) et un bras espaceur par exemple du type polyéthylène glycol. L'introduction d'un tel espaceur entre le silane du substrat et l'oligonucléotide qui sera synthétisé par 25 la suite est intéressante car elle permet d'augmenter, lors de l'utilisation, le rendement de l'hybridation. On protège les fonctions réactives par un groupe tel que le groupe diméthoxytrityle (DMT).

30 On réalise alors une protection de l'ensemble des microcuvettes par des couvercles de polymère déposé sous forme de gouttelettes calibrées par un robot de microdéposition par jets.

Après séchage des gouttelettes, on déprotège par détritylation en milieu acide (TCA) les fonctions ODMT de la surface du substrat non protégé par le polymère. On bloque (capping) ces fonctions réactives de la surface extérieure aux microcuvettes afin de limiter la synthèse *in situ* des oligonucléotides uniquement dans les microcuvettes, puis on élimine le polymère sur l'ensemble du substrat par rinçage dans un solvant.

On réalise ensuite l'étape 2) de dépôt d'un polymère de protection 9 sur au moins l'une des microcuvettes fonctionnalisées de la plaquette, à l'aide d'une micropipette 11 telle qu'un robot dispenseur ou par impression par jets, comme représenté sur la figure 1A.

Sur la figure 1B, on a représenté l'étape suivante qui consiste à éliminer les groupes protecteurs 7 des groupes fonctionnels 5 sur les microcuvettes 3 de la plaquette non recouvertes du polymère de protection 9. On obtient ainsi une plaquette dont les microcuvettes 3 non protégées par le polymère de protection 9, comportent des groupes fonctionnels hydroxyle 5 déprotégés. Cette étape peut être réalisée en trempant la plaquette dans une solution acide, par exemple une solution d'acide trichloroacétique dans du dichlorométhane  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , pour éliminer les groupes trityle.

Sur la figure 1C, on a représenté l'étape suivante 3) de couplage d'une molécule M1 par réaction avec les groupes fonctionnels hydroxyle 5 sur les microcuvettes 3 non protégées par le polymère de protection 9. Dans le cas où l'on veut réaliser une matrice de sondes oligonucléotidiques, les molécules M1

sont constituées par des nucléotides tels que des phosphoramidites, des phosphonates ou des phosphites selon le mode de synthèse utilisé pour la fabrication de la sonde. Dans cette étape, on réalise le couplage du premier nucléotide M1 (phosphoramidite) avec les groupes hydroxyle 5 en immergeant la plaquette dans une solution du nucléotide M1 activé dans l'acetonitrile en présence de tétrazole. On obtient ainsi la structure représentée sur la figure 1C.

Sur la figure 1D, on a représenté l'étape suivante, selon laquelle on bloque les groupes hydroxyle libres restants qui n'auraient pas réagi avec la molécule M1, afin qu'ils ne puissent réagir ensuite avec les autres nucléotides utilisés pour les différents couplages successifs. Cette réaction peut être effectuée par mise en place d'un groupe bloquant 11, par exemple par trempage de la plaquette dans une solution de diméthylaminopyridine DMAP dans du tétrahydrofurane THF.

Dans le cas de la fabrication d'une séquence oligonucléotidique par la méthode utilisant des phosphoramidites, on procède ensuite à une oxydation du phosphore trivalent introduit lors du couplage de l'étape précédente (figure 1C), en phosphore pentavalent plus stable. Ceci peut être réalisé par trempage de la plaquette dans une solution oxydante d'iode dans un mélange d'eau, de pyridine et de tétrahydrofurane THF.

Après cette étape d'oxydation, on réalise l'étape suivante 4) d'élimination du polymère de protection 9 sur les microcuvettes non modifiées. On obtient ainsi la structure représentée sur la figure 1E. Cette élimination du polymère protecteur 9 peut

être réalisée par dissolution dans un solvant approprié en trempant la plaquette dans ce solvant.

Ainsi, mis à part l'étape de dépôt du polymère de protection, les étapes du procédé de 5 l'invention sont réalisées par trempage de la plaquette dans les réactifs et solvants appropriés, suivi de rinçages dans différents solvants, si nécessaire. Ces opérations peuvent se faire dans des récipients avec atmosphère contrôlée. Ces différentes étapes par 10 trempage dans les bains des réactifs appropriés peuvent être avantageusement réalisées dans une cellule réactionnelle, connectée à un synthétiseur automatique d'oligonucléotides.

De plus, les réactifs utilisés sont en 15 grand excès par rapport aux molécules sur le substrat solide, ce qui présente l'avantage d'obtenir des réactions avec un taux de conversion pratiquement de 100 %, ce qui n'était pas le cas avec le procédé de la référence [1] où les réactions sont effectuées par 20 micropipettage des réactifs sur les sites choisis.

Après cette première étape de modification des microcuvettes choisies par le nucléotide M1, on peut modifier d'autres microcuvettes avec une molécule M2, ... ou Mn. Dans ce cas, on procède tout d'abord à 25 une protection des microcuvettes déjà modifiées par le polymère de protection 9. On obtient ainsi la structure représentée sur la figure 1F. Bien évidemment, d'autres microcuvettes du substrat peuvent être également recouvertes du polymère de protection 9 même si elles 30 n'ont pas été modifiées dans les étapes précédentes par la molécule M1. Après cette opération, on élimine alors les groupes protecteurs 7 des groupes fonctionnels hydrophiles 5 des microcuvettes non recouvertes du

polymère de protection 9, puis on couple sur ces groupes fonctionnels 5 un autre nucléotide M2 en opérant de la même façon que précédemment (figures 1B et 1C). La figure 1G illustre la structure obtenue.

5 Après cette opération, on peut procéder au blocage des groupes hydroxyle n'ayant pas réagi, puis à une oxydation du phosphore trivalent en phosphore pentavalent, et à l'élimination du polymère protecteur 9 sur les microcuvettes non modifiées par la molécules 10 M2.

On réalise ensuite de nouveau ces différentes opérations sur les microcuvettes choisies pour obtenir l'enchaînement voulu de molécule M1, pour 15 obtenir ... Mn, soit des oligonucléotides d'enchaînements différents sur des microcuvettes différentes du substrat 1.

A titre d'exemple, on a réalisé une matrice de sondes oligonucléoétidiques sur un substrat en silicium comportant des microcuvettes de 20 100 x 100 x 30 µm gravées dans le silicium. La fonctionnalisation des microcuvettes a été effectuée avec un agent de silanisation constitué par du N,N-(bis-hydroxyéthyl)aminopropyl triméthoxysilane dont les groupes OH sont protégés par un groupe diméthoxy ou 25 monométhoxy trityle.

On décrit ci-après un exemple de réalisation d'une matrice de deux séquences d'oligonucléotides.

On part d'un substrat structuré avec des 30 microcuvettes par utilisation des méthodes classiques de microélectronique à savoir, dépôt, photolithographie et gravure. Un profil de microcuvette 3 est montré sur la figure 2.

Après découpe d'un substrat de silicium en puce de  $2 \times 2 \text{ cm}^2$ , les protocoles de nettoyage (1), silanisation (2) et branchement d'un bras hexaéthylène glycol (3) sont effectués de la manière suivante :

- 5 - 1) Le substrat est incubé pendant 2 heures à température ambiante dans une solution de NaOH (lg NaOH, 3 ml d'eau désionisée DI, 4 ml ETOH 95%), puis rincé à l'eau DI et séché avec une soufflette
- 10 - 2) Le substrat est incubé une nuit à  $80^\circ\text{C}$  dans une solution comportant 1 ml de 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane, 3,5 ml de toluène et 0,3 ml de triéthylamine. Il est rincé à l'acétone, séché à la soufflette, puis mis
- 15 - 3) Le substrat est incubé une nuit à  $80^\circ\text{C}$  dans une solution contenant 15 ml d'hexaéthylène glycol et 9  $\mu\text{l}$  d'acide sulfurique, puis il est rincé dans l'acétone et séché à la soufflette.

20 Le substrat est ensuite positionné dans une pièce spécifique reliée à un synthétiseur automatique d'oligonucléotides EXPEDITE 8909. Le protocole de synthèse utilise la chimie phosphoramidite et comporte quatre étapes : détritylation, couplage, capping, oxydation. Le protocole utilisé est à l'échelle de 25 1  $\mu\text{mole}$ .

Les sept premiers mères sont effectués dans le synthétiseur automatique 3' ATC TCA C 5'. Le substrat est sorti du synthétiseur et est amené sur un robot de dépôt de polymère (Cam/alon) ou le polymère est dispensé sur la moitié des cuvettes. Le profil du remplissage de polymère 9 dans la microcuvette 3 est représenté sur la figure 2. Une vue de dessus des

microcuvettes 3 au microscope optique est montré sur la figure 3 pour des tailles de 300 µm au pas de 600 µm, et sur la figure 4 pour des tailles de 200 µm au pas de 400 µm. Certaines microcuvettes sont vides.

Le substrat est cuit à 85°C pendant 5 min 30's sur une platine chauffante. Le substrat est remis dans le synthétiseur pour effectuer le couplage d'une base C sur la moitié des cuvettes non recouvertes par le polymère. Le polymère est éliminé dans l'eau à 85°C. Un nouveau dépôt de polymère est effectué sur ces dernières cuvettes. Après cuisson, le substrat est positionné dans le synthétiseur pour effectuer le couplage d'une base T dans les autres cuvettes. Après ce couplage, le polymère est éliminé et le substrat est positionné dans le synthétiseur où l'ensemble des cuvettes reçoit les couplages suivants : C AAA TAG. A la fin de cette étape la moitié des microcuvettes contient la séquence NO 1 : -3' ATC TCA CTC AAA TAG 5'- et l'autre moitié la séquence NO 2 : -3' ATC TCA CCC 20 AAA TAG 5'-.  
20

Ces deux séquences se différencient seulement par une seule base. Le substrat est sorti du synthétiseur et il est incubé dans une solution de NH<sub>4</sub>OH pendant 45 min à 60°C, puis il est rincé à l'eau DI et séché à la soufflette afin d'éliminer les groupements protecteurs des bases nucléotidiques.  
25

L'hybridation est effectuée avec la cible complémentaire de la sonde n°2 : -3' CA TAG AGT GGG TTT ATC CA 5' comportant un groupement biotine en 5'. Le substrat est mis dans une solution contenant 690 µl de tampon d'hybridation H-7140 de Sigma et 10 µl de la cible à 1 OD (quantité d'oligonucléotides qui, lorsqu'ils sont dissous dans 1 ml d'eau, résulte en une

absorbance de 1 mesurée à 260 nm dans une cuve de trajet optique égal à 1 cm.) et il est incubé à 40°C pendant 1 heure avec une légère agitation, puis on effectue 2 rinçages dans un bain de tampon SCC 2X 5 pendant 1 minute, et dans un bain de tampon SCC 0,2X pendant 1 minute afin d'éliminer les cibles non hybridées. Le substrat est alors séché à la soufflette. Le couplage de la biotine avec le groupement streptavidine comportant le groupement fluorophore Cy3 10 se fait dans une solution contenant 5 µl de tampon de Streptavidine Cy3 et 700 µl de tampon PBS, TW, NaCl 0,5 M à température ambiante dans l'obscurité pendant 10 à 15 minutes. Le substrat est ensuite rincé 15 dans un bain de tampon PBS, TW, NaCl 0,5M pendant 1 minute, puis dans un bain de tampon PBS et séché à la soufflette.

L'image de fluorescence obtenue après hybridation sur le système microscope confocal à fluorescence GS 3000 indique que seule l'hybridation a 20 lieu avec la sonde complémentaire.

#### Références citées

- 25 [1] : US-A-5 474 796  
[2] : WO-A-97/39 151  
30 [3] : EP-A-0 728 520  
[4] : US-A-5 658 734

## REVENDICATIONS

1. Procédé de réalisation d'une matrice de séquences de molécules chimiques ou biologiques formées d'enchaînements différents de molécules M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, ... M<sub>n</sub>, par synthèse *in situ* sur un substrat structuré avec des microcuvettes, comprenant les étapes suivantes :
  - 1) fonctionnalisation des microcuvettes du substrat par des groupes fonctionnels capables de former une liaison covalente avec les molécules M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, ... M<sub>n</sub> ;
  - 2) dépôt d'un polymère de protection sur au moins l'une des microcuvettes par microdéposition de gouttes dudit polymère pour constituer sur le (les) microcuvette(s) sélectionnée(s) des couvercles de polymère solide ;
  - 3) réalisation d'une ou plusieurs réactions chimiques pour assurer le couplage d'une première molécule M<sub>1</sub> sur les groupes fonctionnels des microcuvettes non recouvertes de polymère de protection ;
  - 4) élimination du polymère de protection sur les microcuvettes recouvertes de ce polymère, après la première réaction ou l'une des réactions suivantes effectuées dans l'étape 3) ; et
  - 5) réalisation à nouveau des étapes 2), 3) et 4) pour obtenir les séquences d'enchaînement voulu sur chacune des microcuvettes fonctionnalisées.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'étape 1) consiste :
  - a) à fonctionnaliser la surface totale du substrat et des microcuvettes par les groupes fonctionnels ;

b) à déposer un polymère de protection sur toutes les microcuvettes par microdéposition de gouttes dudit polymère pour constituer des couvercles de polymère solide sur toutes les microcuvettes ;

5 c) à faire réagir les groupes fonctionnels présents sur le substrat autour des microcuvettes avec un groupe bloquant non labile dans les conditions utilisées pour les réactions chimiques de couplage et pour l'élimination du polymère de protection ; et

10 d) à éliminer le polymère de protection de toutes les microcuvettes.

3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel après l'étape a) on protège les groupes fonctionnels par un groupe protecteur labile, et on effectue une déprotection des groupes fonctionnels 15 après l'étape b) et avant de réaliser l'étape c).

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel on protège les groupes fonctionnels des microcuvettes par un groupe protecteur labile, et dans lequel l'étape 3) comprend 20 une première réaction de déprotection des groupes fonctionnels.

5. Procédé selon la revendication 3 ou 4, dans lequel le groupe protecteur est un groupe trityle 25 ou dérivé de trityle.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel les séquences de molécules sont des oligonucléotides.

7. Procédé selon les revendications 5 et 30 6, dans lequel l'étape 3) est un cycle de synthèse phosphoramidite d'oligonucléotides, qui comprend l'élimination des groupes trityle, le couplage avec un nucléotide, la réaction des groupes fonctionnels qui

n'ont pas été couplés au nucléotide, avec un groupe bloquant, et l'oxydation en phosphate du groupement phosphoramidite du nucléotide.

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel on réalise l'étape 4) d'élimination du polymère de protection après couplage du nucléotide.

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel le polymère de protection est choisi dans le groupe constitué de polymères et de leurs dérivés du type des alcools polyvinyliques, des polystyrènes, des polyvinylcarbazoles et des polyimides.

10. Procédé selon la revendication 7, dans lequel on réalise l'étape 4) d'élimination du polymère de protection, après l'étape 3) d'élimination des groupes trityle.

11. Procédé selon la revendication 10, dans lequel le polymère de protection est un polyhydroxystyrène et la détritylation est effectuée dans du dichlorométhane.

12. Procédé selon la revendication 10, dans lequel le polymère de protection est un polystyrène ou un polyvinylcarbazole, et la détritylation est effectuée dans l'acetonitrile.

13. Procédé selon la revendication 10, dans lequel le polymère de protection est un poly(oxyde d'éthylène), et la détritylation est effectuée dans du toluène.

14. Procédé selon la revendication 10, dans lequel le polymère de protection est un alcool polyvinylique, et la détritylation est effectuée dans du dichlorométhane.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, dans lequel l'étape 4)

d'élimination du polymère de protection est effectuée par rinçage au moyen d'un solvant du polymère en ajoutant cette étape de rinçage dans le cycle d'un synthétiseur automatique d'oligonucléotides.

5 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, dans lequel on dépose le polymère de protection au moyen d'un robot de microdéposition par la technique d'impression par jets d'encre ou de dispenseur de microgouttes calibrées.

10 17. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le polymère étant déposé à partir d'une solution dans un solvant, on recuit le film de polymère formé par chauffage du substrat à une température de 50 à 100°C avant d'effectuer l'étape 3) ou l'étape c).

This Page Blank (uspto)

1 / 3

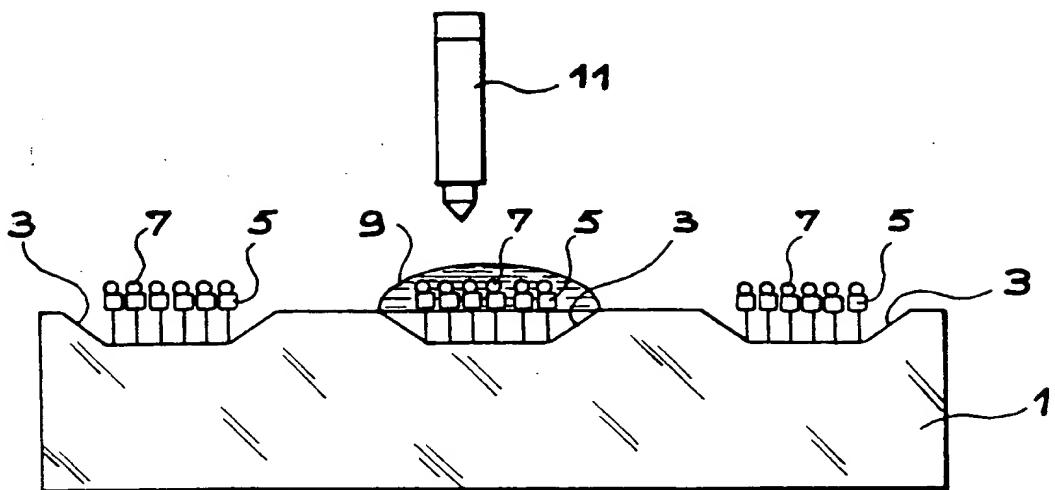


FIG. 1A

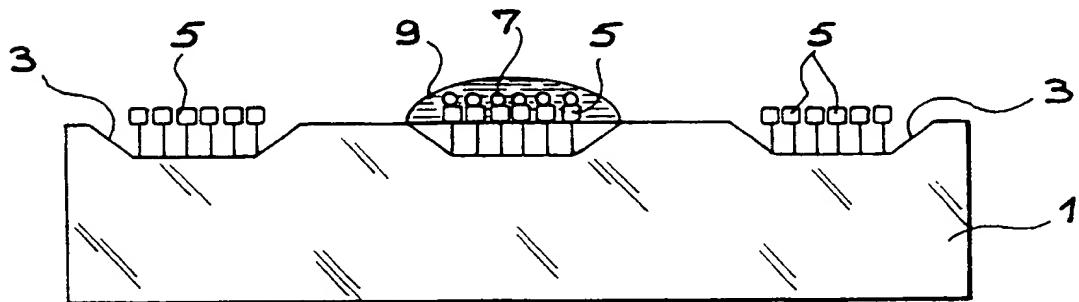


FIG. 1B

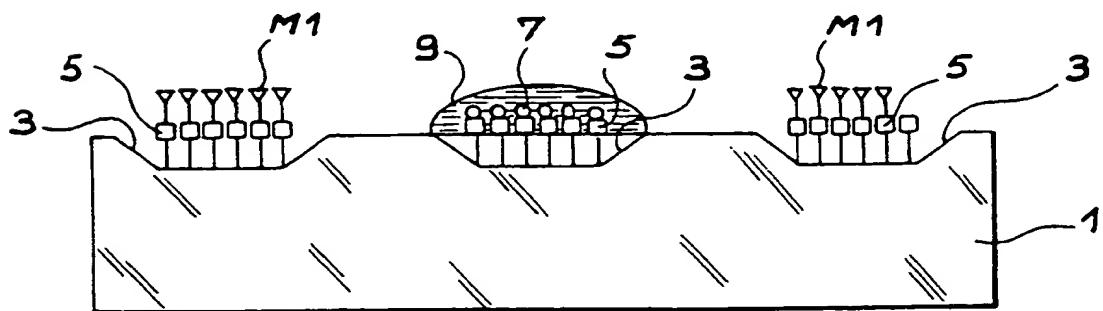
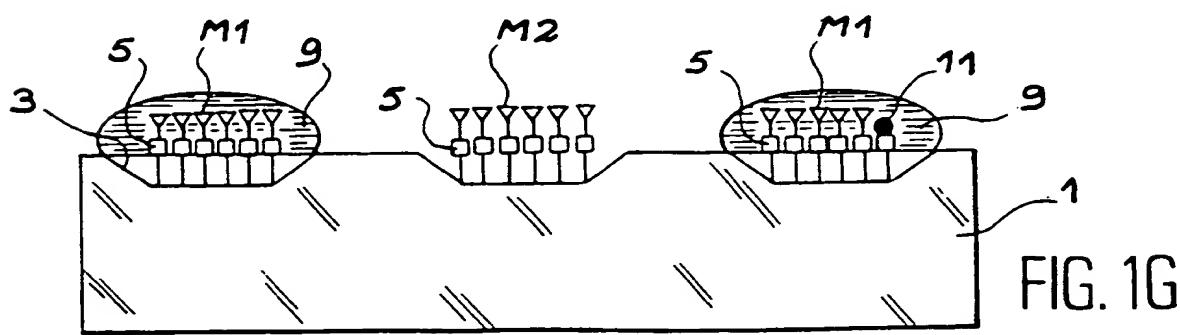
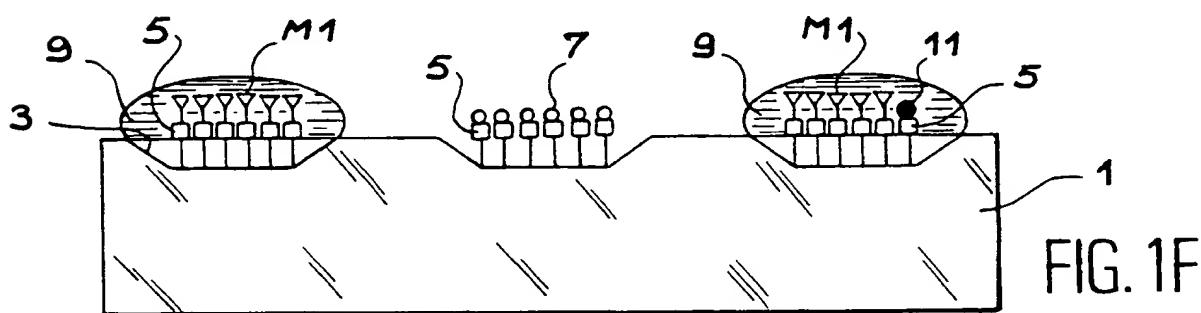
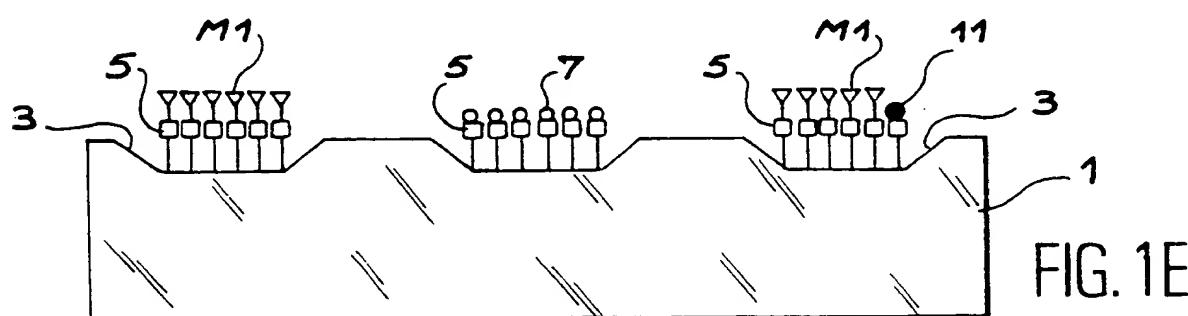
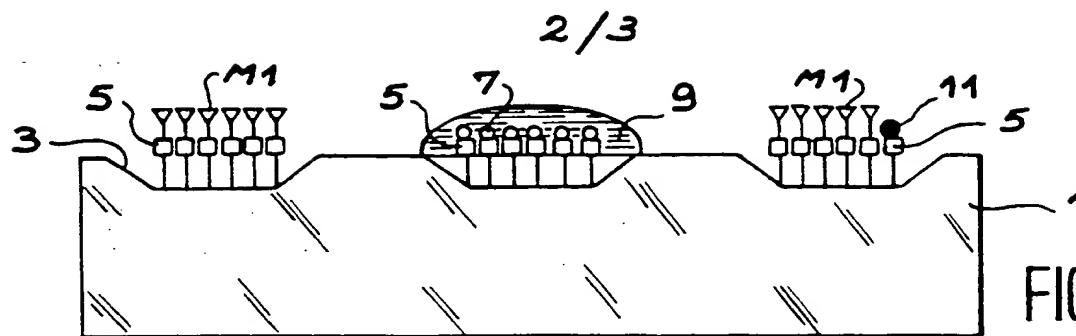


FIG. 1C

This Page Blank (uspto)



This Page Blank (uspto)

3 / 3

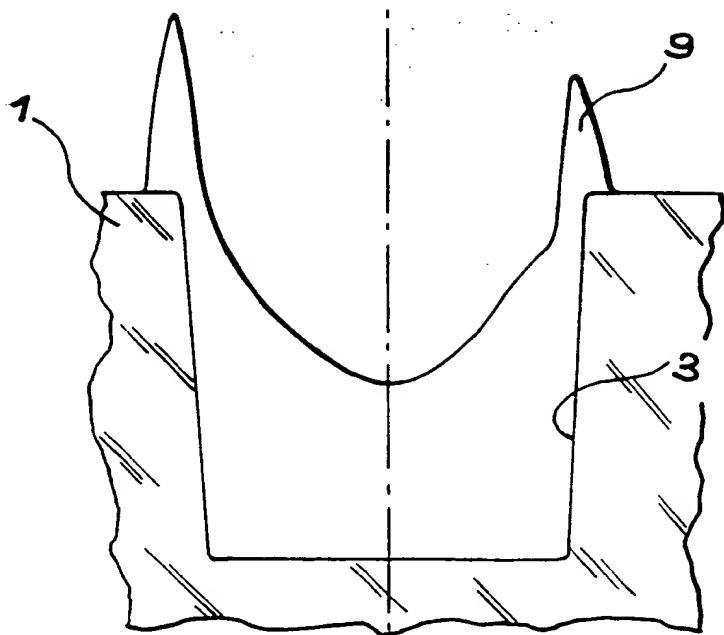


FIG. 2

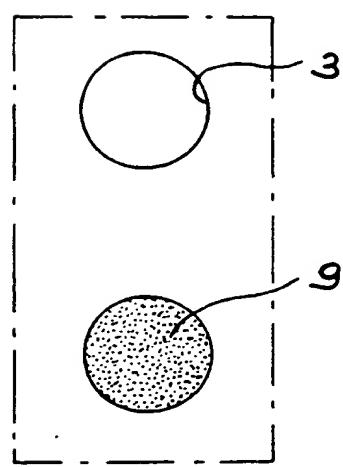


FIG. 3

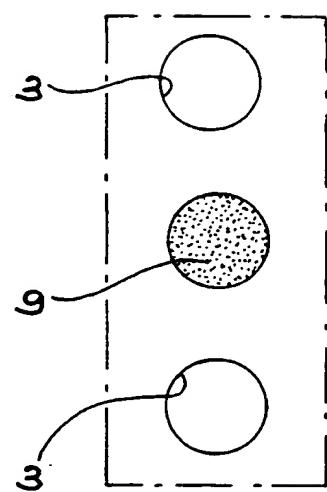


FIG. 4

This Page Blank (uspto)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00550

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
**IPC 7 B01J19/00 C07H21/00**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01J C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 763 263 A (PETER J. DEHLINGER) 9 June 1998 (1998-06-09)	1,6-8, 10,16 2-5,9, 11-15,17
A	figures column 12, line 26 -column 15, line 17 column 9, line 36 -column 10, line 15 column 8, line 65 -column 9, line 13 column 8, line 3 - line 8 column 3, line 54 -column 4, line 22 ---	-/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 May 2000

Date of mailing of the international search report

13/06/2000

## Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stevnsborg, N

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte: nal Application No  
PCT/FR 00/00550

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 728 520 A (AFFYMAX TECHNOLOGIES N.V.) 28 August 1996 (1996-08-28) abstract page 2, line 30 -page 3, column 18 page 3, line 35 - line 58 page 7, line 1 - line 17 page 8, line 44 -page 9, line 54 page 11, line 46 - line 49 figures 1-3,10 ---	1-18
A	US 5 658 734 A (PHILLIP JOE BROCK ET AL.) 19 August 1997 (1997-08-19) abstract column 2, line 53 -column 3, line 17 column 3, line 66 -column 4, line 31 ---	1-17
A	WO 95 35505 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 28 December 1995 (1995-12-28) abstract claims; figures ---	1-17
A	DE 195 43 232 A (HANS-KNÖLL-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG E.V.) 15 May 1997 (1997-05-15) the whole document ---	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00550

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5763263	A	09-06-1998	US 5759779 A		02-06-1998
			AU 7731196 A		19-06-1997
			CA 2238303 A		05-06-1997
			EP 0876206 A		11-11-1998
			WO 9719749 A		05-06-1997
EP 728520	A	28-08-1996	US 5599695 A		04-02-1997
			US 5831070 A		03-11-1998
US 5658734	A	19-08-1997	NONE		
WO 9535505	A	28-12-1995	US 5807522 A		15-09-1998
			AT 180570 T		15-06-1999
			AU 709276 B		26-08-1999
			AU 2862995 A		15-01-1996
			CA 2192095 A		28-12-1995
			DE 69509925 D		01-07-1999
			DE 69509925 T		09-12-1999
			EP 0804731 A		05-11-1997
			EP 0913485 A		06-05-1999
			ES 2134481 T		01-10-1999
			GR 3030430 T		30-09-1999
			JP 10503841 T		07-04-1998
DE 19543232	A	15-05-1997	NONE		

This Page Blank (uspto)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°  
PCT/FR 00/00550

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 B01J19/00 C07H21/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 B01J C07H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 763 263 A (PETER J. DEHLINGER) 9 juin 1998 (1998-06-09)	1,6-8, 10,16 2-5,9, 11-15,17
A	figures colonne 12, ligne 26 -colonne 15, ligne 17 colonne 9, ligne 36 -colonne 10, ligne 15 colonne 8, ligne 65 -colonne 9, ligne 13 colonne 8, ligne 3 - ligne 8 colonne 3, ligne 54 -colonne 4, ligne 22 ---	-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 mai 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Stevnsborg, N

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Dom. Internationale No  
PCT/FR 00/00550

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		no. des revendications visées
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
A	EP 0 728 520 A (AFFYMAX TECHNOLOGIES N.V.) 28 août 1996 (1996-08-28) abrégé page 2, ligne 30 -page 3, colonne 18 page 3, ligne 35 - ligne 58 page 7, ligne 1 - ligne 17 page 8, ligne 44 -page 9, ligne 54 page 11, ligne 46 - ligne 49 figures 1-3,10 —	1-18
A	US 5 658 734 A (PHILLIP JOE BROCK ET AL.) 19 août 1997 (1997-08-19) abrégé colonne 2, ligne 53 -colonne 3, ligne 17 colonne 3, ligne 66 -colonne 4, ligne 31 —	1-17
A	WO 95 35505 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 28 décembre 1995 (1995-12-28) abrégé revendications; figures —	1-17
A	DE 195 43 232 A (HANS-KNÖLL-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG E.V.) 15 mai 1997 (1997-05-15) le document en entier —	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 00/00550

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5763263 A	09-06-1998	US 5759779 A AU 7731196 A CA 2238303 A EP 0876206 A WO 9719749 A	02-06-1998 19-06-1997 05-06-1997 11-11-1998 05-06-1997
EP 728520 A	28-08-1996	US 5599695 A US 5831070 A	04-02-1997 03-11-1998
US 5658734 A	19-08-1997	AUCUN	
WO 9535505 A	28-12-1995	US 5807522 A AT 180570 T AU 709276 B AU 2862995 A CA 2192095 A DE 69509925 D DE 69509925 T EP 0804731 A EP 0913485 A ES 2134481 T GR 3030430 T JP 10503841 T	15-09-1998 15-06-1999 26-08-1999 15-01-1996 28-12-1995 01-07-1999 09-12-1999 05-11-1997 06-05-1999 01-10-1999 30-09-1999 07-04-1998
DE 19543232 A	15-05-1997	AUCUN	

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

**This Page Blank (uspto)**